

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

Reference (

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11) Publication number: **2000019178 A**

(43) Date of publication of application: **21.01.2000**

(51) Int. Cl **G01N 33/545**  
**G01N 33/543**

(21) Application number: **10186159**  
(22) Date of filing: **01.07.1998**

(71) Applicant: **NITTO DENKO CORP**  
(72) Inventor: **SENDA SHUJI**  
**SAIGA TAKESHI**  
**OKADA KEISAKU**

**(54) LABELED COMPLEX**

**(57) Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a labeled immunochemical component suitable for easy, quick and highly sensitive immunoassay.

**SOLUTION:** In this labeled complex, an aqueous polymer dispersion particle is used for a carrier, an immunochemical component selected from the group

comprising an antigen, a hapten or an antibody is immobilized on the surface of the carrier together with an enzyme immobilized on the surface of the carrier, and their total immobilized amount is 5-200 mg per 1 g of the dry polymer dispersion particles. A labeled complex prepared by immobilizing a specific amount of the enzyme and the immunochemical component on the polymer dispersion particle is used to conduct thereby quick and highly sensitive immunoassay of high specificity.

**COPYRIGHT: (C)2000,JPO**

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号  
特開2000-19178  
(P2000-19178A)

(43)公開日 平成12年1月21日(2000.1.21)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	チャート*(参考)
G 0 1 N 33/545		G 0 1 N 33/545	A
33/543	5 2 1	33/543	5 2 1
	5 2 5		5 2 5 G

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全 7 頁)

(21)出願番号	特願平10-186159	(71)出願人	000003964 日東電工株式会社 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号
(22)出願日	平成10年7月1日(1998.7.1)	(72)発明者	千田 修治 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東 電工株式会社内
		(72)発明者	雑賀 健 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東 電工株式会社内
		(72)発明者	岡田 圭策 大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号 日東 電工株式会社内
		(74)代理人	100080791 弁理士 高島 一

(54)【発明の名称】 標識複合体

(57)【要約】

【課題】 簡単、迅速に且つ高感度なイムノアッセイを行うのに好適な標識化された免疫化学的成分の提供。

【解決手段】 水分散型高分子重合体粒子を担体とし、該担体表面に抗原、ハプテンまたは抗体から選ばれる免疫化学的成分が固定されていると共に、酵素が固定されており、これらの総固定量が水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量1gあたり5～200mgであることを特徴とする標識複合体。

【効果】 水分散型高分子重合体粒子に特定量の酵素と免疫化学的成分とを固定して得られる標識複合体を用いることにより、迅速、高感度、且つ特異性の高いイムノアッセイを実施することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水分散型高分子重合体粒子を担体とし、該担体表面に抗原、ハプテンまたは抗体から選ばれる免疫化学的成分が固定されていると共に、酵素が固定されており、これらの総固定量が水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量 1 g あたり 5～200 mg であることを特徴とする標識複合体。

【請求項 2】 免疫化学的成分および／または酵素の担体表面への固定が共有結合で行われている請求項 1 記載の標識複合体。

【請求項 3】 担体表面に固定されている酵素の量が、水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量 1 g あたり 1.0～100 mg である請求項 1 記載の標識複合体。

【請求項 4】 担体表面に固定されている免疫化学的成分 1 モルに対して、0.6～60 モルの比率で酵素が固定されている請求項 1 記載の標識複合体。

【請求項 5】 酵素がペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼから選ばれる少なくとも 1 種である請求項 1～4 のいずれかに記載の標識複合体。

【請求項 6】 担体に固定される酵素がペルオキシダーゼの場合、水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量 1 g 当たりの酵素活性が、5,000～300,000 U である請求項 1～5 のいずれかに記載の標識複合体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は担体として水分散型高分子重合体粒子を用いた標識化された免疫化学的成分の改良に関わる。

## 【0002】

【従来の技術】 抗原抗体反応の高い特異性と検出感度を利用して抗原または抗体を同定、定量する方法の一つに、分別検出の容易な物質で標識した抗原や抗体を用いる標識化免疫測定法 (labeled immunoassay) が知られている。この方法において使用される標識化された抗原または抗体は、一般に、当該抗原または当該抗体に標識剤を結合させることによって得られる (以下、それぞれ標識抗原または標識抗体という)。当該結合は、従来、架橋法により行われてきた。しかしながら、従来の方法では、抗原または抗体が相互に、また標識剤が相互に架橋されてしまい、標識抗原または標識抗体の生成に寄与しない割合が高くなる。従って、収率が低いほか、抗原または抗体上での標識剤の結合密度が著しく少ないために標識剤としての機能も低下する。また、抗原または抗体に結合しうる標識剤の量は、その分子の大きさにより自ずから限られる。また、抗原や抗体に標識剤を直接結合させるという従来の方法では、当該抗原や抗体の活性、機能および特異性等が失われやすいという問題点があった。

【0003】 ところで、近年問題となっている大腸菌 O157 をはじめ、微生物等の食品中や患者からの検出に

多くの日数、煩雑な操作を要する場合がある。さらに疾患によってはより迅速な診断が要求される場合も多い。これらの診断には、上述のような標識化免疫測定法等の種々の免疫測定法 (イムノアッセイ) が好適に用いられている。近年になり迅速かつ簡便にイムノアッセイが行える方法として、免疫クロマトグラフ法が注目されている。当該方法は、例えば以下のようなステップを経る。抗体 (第 1 抗体) を塗布した吸水性基材に菌体等の抗原を付与し、展開させて該第 1 抗体に抗原を捕捉する。続いて該抗原に特異的に結合する標識化された抗体 (第 2 抗体) を付与し、展開させてすでに捕捉されている抗原に結合させる。最終的に吸水性基材上の抗体塗布位置に形成される免疫複合体 (第 1 抗体-抗原-第 2 抗体-標識剤) を目視確認する。その他に EIA (酵素免疫検定法) やプローブを用いた方法等も行われているが、簡便性、迅速性および／または感度等の点において十分なものが得られていないのが現状である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、簡便で、且つ迅速高感度なイムノアッセイを好適に実施し得る、標識化された免疫化学的成分を提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは上記問題点に鑑み、鋭意研究を重ねた結果、水分散型高分子重合体粒子を担体とし、当該担体表面に免疫化学的成分と標識剤としての酵素とを一緒に特定量固定することにより、簡便性、感度および迅速性に優れたイムノアッセイを実施し得る標識化された免疫化学的成分を得ることに成功した。即ち、本発明は以下の通りである。

(1) 水分散型高分子重合体粒子を担体とし、該担体表面に抗原、ハプテンまたは抗体から選ばれる免疫化学的成分が固定されていると共に、酵素が固定されており、これらの総固定量が水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量 1 g あたり 5～200 mg であることを特徴とする標識複合体。

(2) 免疫化学的成分および／または酵素の担体表面への固定が共有結合で行われている上記 (1) 記載の標識複合体。

(3) 担体表面に固定されている酵素の量が、水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量 1 g あたり 1.0～100 mg である上記 (1) 記載の標識複合体。

(4) 担体表面に固定されている免疫化学的成分 1 モルに対して、0.6～60 モルの比率で、酵素が固定されている上記 (1) 記載の標識複合体。

(5) 酵素がペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼから選ばれる少なくとも 1 種である上記 (1) ～

(4) のいずれかに記載の標識複合体。

(6) 担体に固定される酵素がペルオキシダーゼの場合、水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量 1 g 当たりの

酵素活性が、5,000~300,000Uである上記(1)~(5)のいずれかに記載の標識複合体。

【0006】本発明において用いる水分散型高分子重合体粒子は、従来公知のものが好適に使用される。通常、不飽和二重結合を有する単量体の一又は二以上の乳化重合によって調製される。かかる単量体としては、例えば、エチレン、プロピレン等のオレフィン系単量体、酢酸ビニル、塩化ビニル等のビニル系単量体、スチレン、メチルスチレン、クロロスチレン等のスチレン系単量体、アクリル酸メチル等のメタクリル酸エステル系単量体、ブタジエン等のジエン系単量体等が用いられる。また、本発明においては市販されている種々の水分散型高分子重合体粒子も好適に使用することができる。市販されている水分散型高分子重合体粒子としては、例えば、スチレンまたはその誘導体、例えば、p-クロロスチレンからなる単独重合体や共重合体、スチレン-ブタジエン共重合体、スチレン-アクリロニトリル-ブタジエン共重合体等の種々のスチレン共重合体からなるエマルジョンを挙げることができる。また、(メタ)アクリル酸の長鎖アルキルエステルやその誘導体からなる単独重合体や、これらと(メタ)アクリル酸メチルやエチル、グリシジル(メタ)アクリレート等との共重合体も本発明において用いられる。上述したスチレンやその誘導体と、(メタ)アクリレートエステルやその誘導体との共重合体も用いられる。

【0007】個々の単量体の具体的な種類は、得られる水分散型高分子重合体粒子を免疫化学的成分とともに酵素を固定した複合体(以下単に標識複合体ともいう)として用いる場合に、その使用時や保存時に融着、凝集を起こさないように、当該重合体粒子が所要のガラス転移点を有するように選ばれる。水分散型高分子重合体粒子のガラス転移点は、好ましくは10℃以上、特に室温(25℃)以上である。

【0008】本発明において用いる水分散型高分子重合体粒子は、その粒子径が0.01~3μm、好ましくは0.1~2μmである。本発明においては、当該重合体粒子に免疫化学的成分および酵素を共に固定することを特徴とするが、当該重合体粒子の粒子径が3μmを超えるときは、水性媒体中で粒子が沈降しやすくなり、均等に分散されず、免疫化学的成分および/または酵素が十分に固定されず、また固定量にバラツキが出やすくなる。一方、0.01μmよりも小さいときは、免疫化学的成分および酵素を固定した後の当該粒子の精製が煩雑となり、また、困難となる。

【0009】本発明において水分散型高分子重合体粒子に、標識剤として固定される酵素としては、従来より固相イムノアッセイに用いられている任意の酵素を用いることができる。具体的にはペルオキシダーゼ、β-D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、エステラーゼ、β-

D-グルクロニダーゼ等が挙げられる。好ましくはより高感度なイムノアッセイを達成することが可能なペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼであり、特に好ましくはペルオキシダーゼである。本発明の標識複合体を種々のイムノアッセイに使用する場合、固定した酵素の種類に応じて従来公知の発色基質、検出方法が選択され、発色の程度や活性の変化等により被検物質の検出、定量が行われる。

【0010】本発明において、水分散型高分子重合体粒子に固定される免疫化学的成分は、被検物質と特異的に結合する物質であれば特に限定されず、抗原、ハプテンや抗体等が例示される。免疫化学的成分は、その用途に応じて、例えば被検物質の検出や定量の為に使用するのであれば測定すべき被検物質に応じて、サンドイッチ法等の通常のイムノアッセイで用いられる公知のものを適宜選択すればよい。当該免疫化学的成分が抗原若しくはハプテンの場合、当該抗原ならびにハプテンとしてはクラミジア・トラコマティス、溶連菌、百日咳菌、ヘリコバクター・ピロリ、レプトスピラ、トレポネーマ・パリダム、トキソプラズマ・ゴンディ、ボレリア等の各種細菌抗原、マイコプラズマ脂質抗原、HA抗原、HBc抗原、HBs抗原、HBs抗原、HCV抗原、HIV抗原等が挙げられる。当該免疫化学的成分が抗体の場合、当該抗体としてはモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を使用することができる。具体的には、抗大腸菌抗体、抗O157抗体、抗サルモネラ菌抗体、抗ペロトキシシン抗体、抗ヒトトランスフェリン抗体、抗ヒトアルブミン抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体、抗マイクログロブリン抗体、抗CRP抗体、抗トロポニン抗体、抗HCG抗体、抗クラミジア・トラコマティス抗体、抗ストレプトリジンO抗体、抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、抗β-グルカン抗体、抗HBs抗体、抗HBs抗体、抗アデノウイルス抗体、抗HIV抗体、抗ロタウイルス抗体、抗RF抗体等が挙げられる。

【0011】1種類の免疫化学的成分を固定する場合に加え、必要に応じて数種類の被検物質とそれぞれ特異的に結合する、数種類の免疫化学的成分を混合して固定することも可能である。

【0012】本発明の標識複合体は、担体としての水分散型高分子重合体粒子に、免疫化学的成分とともに酵素を固定することにより得られるが、それらの総固定量は、水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量1gあたり5~200mgであり、その量は上記の範囲内で使用する免疫化学的成分や酵素の種類、活性の程度等によって適宜変更し得る。総固定量が5mgより少ないと、免疫化学的成分および酵素の絶対的な不足により、被検物質を検出することが困難となり、さらに迅速性、感度、再現性等に劣ることになる。また、担体である水分散型高分子重合体粒子の表面積に鑑みると、合わせて200mgより多くの免疫化学的成分および酵素を固定することは

困難である。また、多数のタンパク質が粒子表面を覆うことによりカルボキシル基同志の反発が起こりにくくなり、粒子が凝集してしまう。本明細書において、水分散型高分子重合体粒子において「乾燥重量」とは、一定量の水分散型高分子重合体粒子を120℃で2時間乾燥した状態をいう。

【0013】より迅速、且つ高感度なイムノアッセイを期待して本発明の標識複合体を用いる場合には、当該担体に固定される酵素は、その種類により適宜変更し得るが、通常水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量1gあたり1.0~100mgであることが好ましい。また当該酵素は、免疫化学的成分1molあたり0.6~60molの比率で当該水分散型高分子重合体粒子に固定されることが好ましい。当該固定される酵素が1.0mgより少ないと、絶対的な酵素の不足、すなわち標識剤の不足により、被検物質を検出することが困難となり、また迅速性、感度、再現性等に劣ることになる。100mgより多いと、逆に担体表面に固定されるべき免疫化学的成分の量が減少することになり、この場合もやはり迅速性、感度、再現性等に劣ることになる。また、免疫化学的成分1molあたりの酵素の量が0.6molより少ないと十分な感度を得ることができず、水分散型高分子重合体粒子を介することによってより多くの酵素を結合させることができるという、本発明の利点が十分に生かされない。また、免疫化学的成分1molあたりの酵素の量が60molを超えるようであれば、当該水分散型高分子重合体粒子の表面積との関係により、必然的に当該粒子あたり固定される免疫化学的成分の量が減少することになり、感度の低下が起こりうる。さらに、過剰の酵素によりバックグラウンドが高まり、特異性の低下が起こる。

【0014】本発明において、固定される酵素の量はその活性としても表すことができる。勿論、固定される酵素の種類、その基質、温度等種々の条件によって異なる。担体に固定される酵素がペルオキシダーゼである場合には、活性は以下の方法で測定する。基質である、TMB(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) 0.2mg/mlと過酸化水素0.01%を含む0.1M-クエン酸緩衝液(pH4.5) 3.3ml中に、本発明の標識複合体0.0125%懸濁液を100μl混合して、25℃で反応、580nmの波長での吸光度を経時的に測定し、1分間に当該吸光度を1増加させる酵素活性を1U(ユニット)として換算する。ペルオキシダーゼの場合、本発明の標識複合体が、水分散型高分子重合体粒子の乾燥重量1gあたり、5,000~300,000U、好ましくは10,000~300,000U、より好ましくは50,000~300,000Uの酵素活性を有するように当該酵素が固定されている事が望ましい。酵素活性が低すぎると被検物質を迅速に検出することが困難となり、また高すぎるとバックグラウンドが高まり特異性が低下する。

【0015】免疫化学的成分ならびに酵素の固定量の測定はCoomassie brilliant blue G-250を用いた色素結合法(化学と生物・タンパク質定量法(廣川書店)、Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254、Bio-Rad Lab. (1984) Bio-Rad PROTEIN ASSAY, Instruction Manual 等参照)を用いて測定し、タンパク質の量として算出する。具体的な測定条件は後述の実験例に記載のとおりである。

【0016】本発明において免疫化学的成分および/または酵素の担体としての水分散型高分子重合体粒子への固定は共有結合によって好適に行われる。免疫化学的成分および/または酵素を上記水分散型高分子重合体粒子に共有結合にて直接または後述するように、所謂スペーサー基を介して結合する場合には、当該粒子はその表面に官能基を有することが必要である。このような官能基としては、例えばカルボキシル基、水酸基、グリシジル基、アミノ基、ホルミル基、カルバモイル基、イソチオシアナート基、アジドカルボニル基、ヒドラジド基、酸無水物基等を挙げることができ、好ましくはカルボキシル基が導入される。これらの官能基を有する水分散型高分子重合体粒子を調製するには、単量体成分として、例えば、アクリル酸、メタクリル酸のようなカルボキシル基を有する単量体、例えばヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシメチルメタクリレートのような水酸基を有する単量体、例えば、グリシジルメタクリレートのようなグリシジル基を有する単量体を、必要に応じて、他の共重合性単量体と乳化合重させることによって、それぞれカルボキシル基、水酸基およびグリシジル基を有する水分散型高分子重合体粒子を得ることができる。また、所要の単量体成分を重合させた後、得られた水分散型高分子重合体粒子に官能基を導入することもできる。

【0017】本発明においては、水分散型高分子重合体粒子に免疫化学的成分および/または酵素を共有結合によって結合するに際して、必要に応じて、免疫化学的成分および/または酵素の当該重合体粒子上での自由度を高めるために、スペーサー基を介在させることができる。このスペーサー基は、予め水分散型高分子重合体粒子に結合させ、後に当該スペーサー基と免疫化学的成分および/または酵素とを結合させてもよく、或いはスペーサー基を予め免疫化学的成分および/または酵素に結合させ、これを当該重合体粒子に結合させてもよい。更に、必要に応じて、水分散型高分子重合体粒子、免疫化学的成分および酵素の全てに予めスペーサー基を結合させ、これらを相互に結合させることもできる。

【0018】スペーサー基として用い得る化合物は、少なくとも二官能性の有機化合物であり、多官能性の重合体を排除するものではないが、特に炭素数1~12の炭素鎖を有する二官能性の有機化合物が好ましい。このようなスペーサー基として機能する化合物の具体例とし

て、例えば、ヘキサメチレンジアミン、ドデカメチレンジアミン、キシリレンジアミン等のジアミン類、グリシン、 $\beta$ -アミノプロピオン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、 $\epsilon$ -アミノカプリル酸等のアミノアルキルカルボン酸、リジン、グルタミン酸、 $\beta$ -アラニン、アルギニン、グリシルグリシルグリシン等のアミノ酸類等が好ましく用いられるが、これらに限定されるものではない。

【0019】官能基を有する水分散型高分子重合体粒子に直接またはスペーサー基を介して免疫化学的成分および/または酵素を共有結合にて結合するための方法は、特に限定されず、従来より知られている任意の方法によることができる。例えば、好ましい方法の一つとして、結合試薬として水溶性カルボジイミドを用いる方法を挙げることができる。例えば、アミノアルキルカルボン酸をスペーサー基として用いる場合であれば、水溶性カルボジイミドを用いて、アミノアルキルカルボン酸を水分散型高分子重合体粒子に結合させ、次いで、当該重合体粒子に結合されたアミノアルキルカルボン酸に水溶性カルボジイミドを用いて同様に、免疫化学的成分および/または酵素を共有結合にて結合させることができる。

【0020】かかる方法において用いる水溶性カルボジイミドとしては、例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメト-*p*-トルエンスルホネート等を挙げることができる。このような水溶性カルボジイミドを用いて、スペーサー基を介してまたは介さずして直接に、共有結合によって免疫化学的成分および/または酵素を水分散型高分子重合体粒子に結合させるには、従来より知られている通常の方法および条件によることができる。

【0021】本発明において、免疫化学的成分および酵素を水分散型高分子重合体粒子に固定する方法としては上述の共有結合法以外に、従来より知られている任意の方法、例えば、物理吸着法やイオン結合法等によって結合させてもよい。好ましくは共有結合法である。

【0022】本発明において、免疫化学的成分および酵素の水分散型高分子重合体粒子への結合は上述の方法により両者を同時に固定してもよいし、別々に固定してもよい。

【0023】このように水分散型高分子重合体粒子に免疫化学的成分および酵素を結合させた後、すなわち標識複合体を調製した後、例えば膜分離法や濾過、遠心分離法等、従来の通常の方法によって、本発明の標識複合体を分離精製することができる。このようにして得られた本発明の標識複合体は、水中に浸漬して保存してもよく、または凍結乾燥して保存してもよい。

【0024】本発明の標識複合体は、上述の如く、担体としての水分散型高分子重合体粒子に免疫化学的成分と

ともに標識剤としての酵素が固定されており、各種イムノアッセイに好適に使用される。具体的には、ELISA法、組織や細胞の染色、免疫クロマトグラフ法等に用いられる。例えば免疫クロマトグラフ法においては、本発明の標識複合体は、基材中に予め含有させ、試料の展開中に抗原との複合体を形成させる方法、試料と混合し、複合体を形成させたのち基材上で展開させる方法、試料の展開後に単独で展開させる方法等、種々の態様で使用される。

【0025】

【実施例】以下に本発明の実施例を挙げ、さらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

実施例1：標識複合体の作製（酵素-抗体固定化担体）

1) 水分散型高分子重合体粒子懸濁液の作製

スチレン50g、アクリル酸0.5g、トリエチレングリコールジメタクリレート0.2g、蒸留水440gからなる混合液を窒素ガス雰囲気下で75℃に維持、撹拌しながら、重合開始剤としての過硫酸カリウム0.25gを蒸留水10gに溶解した水溶液を加え、10時間重合を行った。その結果、カルボキシル化された水分散型高分子重合体粒子としてカルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子（平均粒子径は0.2 $\mu$ m）を得た。得られたカルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子を0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.2に固形分濃度が5重量%になるように分散した。

【0026】2) 固定化

i) 免疫化学的成分の固定

本実施例では免疫化学的成分として抗体を上記1)で作製したラテックス粒子に以下のようにして固定した。上記ラテックス粒子の分散液3mlに、水溶性カルボジイミド(DOJIN社製、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、10mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.2)0.5ml、ヤギ抗E.coli O157:H7ポリクローナル抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.社製、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.2)2mlを加えて10℃で3時間反応させた後、洗浄液として0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.2を用いて遠心分離洗浄を行い、同緩衝液で固形分濃度5重量%に調製した。

【0027】ii) 酵素の固定

次いで、上記で作製した抗体固定化ラテックス粒子懸濁液3mlに、水溶性カルボジイミド(DOJIN社製、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、10mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.2)1ml、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(以下HRPと略す：和光純薬社製、1.2mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.2)2mlを加えて10℃で3時間反応させたのち、洗浄液として

10

20

30

40

50

0.01Mホウ酸緩衝液(pH8.2)を用いて遠心分離洗浄を行った。同緩衝液で固形分濃度2重量%に調製し、ヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体およびHRPを固定化したラテックス粒子を作製した。

#### 【0028】実施例2

酵素の固定の際、1.2mg/mlの濃度に調製したHRPの代わりに、12mg/mlの濃度に調製したHRPを用いる以外は全て実施例1と同様にしてヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体およびHRPを固定化したラテックス粒子を作製した。

#### 【0029】実施例3

酵素の固定の際、1.2mg/mlの濃度に調製したHRPの代わりに、60mg/mlの濃度に調製したHRPを用いる以外は全て実施例1と同様にしてヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体およびHRPを固定化したラテックス粒子を作製した。

【0030】実験例1 抗体および酵素の固定量の測定 実施例1〜3で作製したヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体およびHRPを固定化したラテックス粒子について、抗体および酵素の各固定後の上清をタンパク定量し、その値からラテックス粒子の乾燥重量1gあたりの各固定量を算出した。当該タンパク定量は以下のようにして行った。

【0031】(タンパク定量一色素結合法(Bradford法)) 固定化抗体、酵素量の定量にはCoomassie Brilliant Blue G-250による色素結合法を用いた。実際の測定は、市販キットである『Coomassie Protein Assay Reagent』(PIERCE社製)を使用した。測定法は付属の手順書に従った。検量線は、濃度既知の該抗体、該酵素溶液を用いて上記の試薬にて発色した後、595nmの吸光度を測定して作成した。適宜希釈した各固定化後の上清を、上記の試薬にて発色させた後、595nmの吸光度を測定、検量線から当該抗体ならびに当該酵素の濃度を算出した。測定時は室温(25℃)で行った。反応時間は特に限定がないが、発色後90分以内に吸光度測定を実施した。

【0032】その結果、抗体(分子量約16万)の固定量は各実施例とも11.1mg、酵素(分子量約4万)の固定量は実施例1では1.8mg、実施例2では17.3mg、実施例3では35.1mgであった。また、上記結果より抗体1分子あたりの酵素数を算出すると、実施例1では0.6分子、実施例2では6.2分子、実施例3では35.1分子であった。

【0033】実験例2 抗体および酵素がともに固定されたラテックス粒子の酵素活性の測定

実施例1〜3で作製したヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体およびHRPを固定化したラテックス粒子について、その酵素活性を測定した。当該酵素活性は以下のようにして測定した。

【0034】(ラテックス粒子の酵素活性測定法) TM B (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) membrane Peroxidase Substrate System(Kirkegaard & Perry Laboratories inc. 社製、pH4.5)を基質液として使用する。キュベット内で、上記の基質液3.3mlに0.0125重量%に希釈した酵素-抗体固定化ラテックス粒子分散液0.1mlを混合し25℃で反応、分光光度計で580nmにおける1分間の吸光度上昇を測定する。580nmにおける吸光度を1分間に1上昇させる活性を1U(ユニット)と定義し、ラテックス粒子の乾燥重量1gあたりの活性で表現する。

【0035】結果、ラテックス粒子の乾燥重量1gあたり実施例1では10,160U、実施例2では85,230U、実施例3では267,180Uであった。

#### 【0036】比較例1: 酵素非固定担体

青色着色カルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子分散液(固形分濃度5重量%、平均粒子径0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8)に水溶性カルボジミド(DOJIN社製、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、10mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8)0.5ml、およびヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.社製、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8)2mlを加えて10℃で3時間反応させた後、洗浄液としてホウ酸緩衝液(pH8)を用いて遠心分離洗浄を行い、青色着色ラテックス粒子標識抗E.coliO157:H7抗体を作製した(固形分濃度2重量%)。

【0037】実験例3: 免疫クロマトグラフ型試験片への使用

#### 1) 試験片の作製

ニトロセルロースメンブレン(孔径8μm、6mm×60mm)の一端から30mmの箇所にヤギ抗E.coliO157:H7ポリクロナール抗体(1mg/ml、0.1Mリン酸緩衝液pH7.4)を1.5μl、ディスペンサーを用いてライン状に塗布した(固定相)。このメンブレンをウシ血清アルブミン(オリエンタル酵母社製、1重量%)およびポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(和光純薬工業社製、0.1重量%)からなる水溶液中に10分間浸漬させたのち、40℃で2時間乾燥させた。次いで、このメンブレンの裏側(抗体塗布面の反対側)にポリエステルフィルム(100μm厚)をスプレー糊を用いて貼り合わせた。抗体塗布箇所の反対端から0〜8mmの箇所にポリエステル不織布(6mm×8mm、厚さ2.5mm)を貼り合わせた。さらに、上記ポリエステル不織布を貼り合わせた反対端0〜10mmの箇所に吸水用のパッドとしてバルブ不織布(10mm×10mm、厚さ5mm)を貼り合わせて試験片を作製した。当該試験片を4つ作製して、以下の測定に用いた。

## 【0038】2) 測定

0.1Mリン酸緩衝液(0.9重量%NaCl含有、pH7.4)に、E. coliO157:H7を表1に示した濃度で分散させた被検試料を調製した。この被検試料に実施例1〜3で作製したヤギ抗E. coliO157:H7ポリクロナール抗体およびHRPを固定化したラテックス粒子ならびに比較例1で作製した抗E. coliO157:H7ポリクロナール抗体を固定化した青色着色ラテックス粒子(酵素は固定されていない)を、それぞれ固形分濃度0.02重量%となるように別個に混合した後、各混合液60 $\mu$ lを上記1)で作製した各試験片のポリエステル不織布部に別々に滴下した。実施例1〜3で作製した、抗体および酵素が共に固定されているラテックス粒子を用いた試験片については5分後、0.1Mリン酸緩衝液60 $\mu$ lを同不織布部に滴下して\*

\* 洗浄を行い、さらに5分後、TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) membrane Peroxidase Substrate System(Kirkegaard & Perry Laboratories inc. 社製、pH4.5)60 $\mu$ lを同不織布部に滴下し、10分後の発色の有無を目視観察した。一方、比較例1で作製した、酵素を固定していない青色着色ラテックス標識抗体を用いた試験片については被検試料と当該青色ラテックスの混合液を添加して20分後に発色の有無を確認した。結果を表1に示す。なお、各表における判定基準は以下の通りである。

【0039】+: 固定相にライン状の発色が見られる。

-: 固定相にライン状の発色が見られない。

【0040】

【表1】

	被検試料濃度 (cells/ml)					
	1 $\times 10^3$	1 $\times 10^4$	5 $\times 10^3$	1 $\times 10^3$	1 $\times 10^2$	0
実施例1	+	+	+	+	-	-
実施例2	+	+	+	+	-	-
実施例3	+	+	+	+	-	-
比較例1	+	-	-	-	-	-

【0041】従来の酵素が固定されていない、すなわち着色ラテックスによる標識では、検出するのに1 $\times 10^5$ 個/ml程度の菌数が必要であったが、本発明の酵素と抗体とが共に固定された水分散型高分子重合体粒子(標識複合体)を用いた免疫クロマトグラフ法では、1 $\times 10^3$ 個/ml程度の濃度でE. coliO157:H7を検出することができた。また、厚生省O157研究会報告、「食品衛生研究」, 48, 35(1998)には、従来の免疫クロマトグラフ法(着色ラテックスによる標識)や標識剤としての酵素が直接結合した抗体を用いる酵素免疫クロマトグラフ法を用いたO157の検出感度が1 $0^5 \sim 10^6$ 個/ml程度であることを報告している。

これら従来の方法に比べ、本発明の標識複合体を用いた免疫クロマトグラフ法では100~1000倍程度高い感度を達成することができ、また所要時間の短縮化も可能であった。

【0042】

【発明の効果】本発明の標識複合体においては、担体表面に免疫化学的成分及び活性を維持した状態の酵素が特定量固定されていることにより、高感度高精度な免疫アッセイを行うことができる。また、免疫化学的成分と酵素とを一工程で処理することができるので、迅速な測定が可能となる。しかも、当該標識複合体は、その製造および精製が容易である。